



KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 100149793 B1
(43)Date of publication of application:
09.06.1998

(21)Application number: 1019950066342
(22)Date of filing: 29.12.1995

(71)Applicant: PACIFIC CO., LTD.
(72)Inventor: CHOI, SEON AH
KIM, DEOK HEE
KIM, MU SEONG
KIM, SEUNG JEONG
YANG, CHANG MO

(51)Int. Cl C08B 37 /08

(54) METHOD FOR PURIFYING HIGH MOLECULAR WEIGHT OF HYALURONIC ACID

(57) Abstract:

PURPOSE: High molecular weight of hyaluronic acid is purified by effectively removing nucleic acid, protein, exothermic material and low molecular weight of hyaluronic acid. CONSTITUTION: 1 g of crude hyaluronic acid is dissolved in 1 g of H₂O, followed by addition of 50 g of polypropylene or hydrophobic polymer such as polyethylene, modified polypropylene or poly styrene at room temperature for 2 hours and filtrated. 50 g of active alumina is added in the filtrate, and stirred at 10-15 deg.C for 3 hours, separated, adjusted to pH 7.0, filtrated again. 40 g of sodium chloride is added in the obtained filtrate, and precipitated by 2 g of ethanol. The precipitates is separated and washed by 95 % ethanol, and vacuum-dried to give 0.7 g of sodium hyaluronic acid.

COPYRIGHT 2000 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19951229)
Notification date of refusal decision (00000000)
Final disposal of an application (registration)
Date of final disposal of an application (19980529)
Patent registration number (1001497930000)
Date of registration (19980609)
Number of opposition against the grant of a patent ()
Date of opposition against the grant of a patent (00000000)
Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

(51) Int. Cl. C08B 37/08		(11) 등록번호 (24) 등록일자	특0149793 1998년06월09일
(21) 출원번호	특1995-066342	(65) 공개번호	특1997-042603
(22) 출원일자	1995년12월29일	(43) 공개일자	1997년07월24일
(73) 특허권자	주식회사태평양, 이능희 대한민국 140-012 서울시 용산구 한강로2가 181번지		
(72) 발명자	김덕희 대한민국 서울시 마포구 합정동 430-16 양창모 대한민국 경기도 성남시 분당구 야탑동 쌍용아파트 501동 303호 최선아 대한민국 경기도 의왕시 삼동 161-13 협성빌라 307호 김무성 대한민국 경기도 수원시 팔달구 우만동 555-3 김승정 대한민국 서울시 영등포구 신길6동 우성아파트 205동 1301호		
(74) 대리인	윤동열 이선희		
(77) 심사청구	심사관: 한현숙		
(54) 출원명	고분자량 히알우론산의 정제방법		

요약

본 발명은 고분자량의 히알우론산을 정제하는 방법에 관한 것으로, 발효에 의해 생산된 조 히알우론산을 소수성 폴리머와 접촉시키고 순차적으로 활성알루미나에 접촉시켜 불순물 및 저분자량의 히알우론산을 선택적으로 흡착 분리 제거하며 수용성 유기용매를 첨가시켜 히알우론산 나트륨의 침전을 석출시켜 모액과 침전을 분리한 후, 진공건조하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 히알우론산의 정제방법을 제공한다.

명세서

[발명의 명칭]

고분자량 히알우론산의 정제방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 고분자량의 히알우론산을 정제하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 발효에 의해 생산된 조 히알우론산을 소수성 폴리머와 접촉시키고 순차적으로 활성알루미나에 접촉시켜 불순물 및 저분자량의 히알우론산을 선택적으로 흡착 분리 제거하며 수용성 유기용매를 첨가시켜 히알우론산 나트륨의 침전을 석출시켜 모액과 침전을 분리한 후, 진공건조하는 공정을 포함하는 히알우론산의 정제방법에 관한 것이다.

히알우론산은 1934년 메이어(Meyer)가 소의 초자체로부터 분리하여 명명한 대표적인 유코다당으로 D-글루쿠론산과 N-아세틸-D-글루코사민 부위로 구성되어 진 생체 고분자 물질로 세포 표면과 척추동물의 결합조직에 있어서 기본 세포의 물질, 관절의 활액, 땀줄 및 닭 벼슬에 존재하며 생물체에서 안구의 유리액 및 관절의 활액 같은 생리 유동액의 필수성분이며 체액량 조절 및 염증과정에서 생기는 유리수산기의 제거, 혈관형성 과정등의 생물학적 과정에서 중요한 역할로 인해 안과수술시의 완충제, 관절염 및 화상치료제등 의약품으로 광범위하게 쓰이고 있다. 특히 안과 수술시 완충제로서의 역할을 위해서는 점탄성이 커야하고 결국 고분자량의 히알우론산의 요구된다.

아 생산비용이 높을 뿐아니라 자원적인 제약등의 문제가 있다. 이의 해결을 위해 스트렙토코커스속의 미생물에 의해 발효법으로 히알루론산의 제조가 이루어지고 있다. 발효법에 의해 제조된 히알루론산은 추출법에 비해 일정한 원료로 표준화된 방법에 의해 제조되기 때문에 제품의 품질이 균일하게 보존되어 산업상의 이용가치가 크다. 그러나 발효법에서는 발열성물질등이 불순물로 존재하므로 고순도의 제품을 얻기 위해 그것을 분리 제거하여야 한다. 미국 특허4,780,141호 및 미국 특허 4,784,990호에서는 스트렙토코커스 주 에피더미커스를 배양시킨 배양액에 이소프로판올, 에탄올등을 순차적으로 가하여 석출-용해 과정을 수회 반복한 후 활성탄으로 처리하고 다시 염화세틸피리디늄등의 제4급 암모늄 염과 히알루론산과의 부가물을 형성하여 히알루론산을 선택적으로 침전시킨 후 불순물을 분리하고 그 후 Florisil등의 규산마그네슘의 컬럼을 통과시키는 방법이 제시되어 있으며, 일본공개특허공보 88-12293호에는 스트렙토코커스 주 에피더미커스를 배양시킨 활성탄을 가하여 교반하고 여과한 후 그처리액을 다공성망상구조의 음이온 교환수지에 통과시킨 다음 메탄올, 에탄올, 이소프로판올등을 가하여 히알루론산 침전을 석출시킨 후 다시 염화나트륨 수용액에 용해하고 아세톤, 메탄올, 에탄올, 아세토니트릴등의 수용성 유기용매를 가하여 발열성 물질, 단백질등을 제거하는 방법이 공지되어 있다. 또한 일본공개특허공보 88-270701호에서는 히알루론산 용액과 양이온 계면활성제의 부가물을 선택적으로 침전시킨 후 이를 초산나트륨 용액에 용해시키고 그 용액을 흡착수지, 이온교환수지, 및 활성탄 컬럼을 통과시키고 통과액에 분말 활성탄을 첨가하여 여분의 계면활성제를 제거, 정제하는 방법이 제시되어 있다.

일반적으로 히알루론산을 의약품으로 이용하려면 발열성물질, 단백질 및 색소등이 충분히 제거된 고순도의 히알루론산을 제조하여야 하나 위에 열거한 방법으로 발열성물질, 단백질 및 색소등을 어느 정도 제거하는 효과가 있지만 완전한 제거에는 불충분 하다. 따라서 의약품으로 사용 가능한 고품질의 히알루론산을 얻는 방법의 개발이 필요하다.

이에, 본 발명자들은 고분자량 히알루론산의 정제방법에 대해 여러 가지를 검토한 결과, 소수성의 폴리머가 발열성 물질에 대하여 친화력이 있으며, 동시에 핵산 제거능이 있다는 것을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명은 발효법에 의해 얻어진 히알루론산에 적용되는 것으로 종래의 방법에서 문제가 되었던 핵산, 단백질, 발열성 물질 및 저분자량의 히알루론산을 효율적으로 제거하여 고순도, 분자량의 히알루론산을 제조하며, 연속 교반 처리에 의해 공정이 간편해진 효과가 있다.

본 발명은 히알루론산 함유액을 고분자량의 히알루론산을 정제하는 방법에 관한 것으로, 발효에 의해 생산된 조 히알루론산을 소수성 폴리머와 접촉시키고 순차적으로 활성알루미나에 접촉시켜 불순물 및 저분자량의 히알루론산을 선택적으로 흡착 분리 제거하며 수용성 유기용매를 첨가시켜 히알루론산 나트륨의 침전을 석출시켜 모액과 침전을 분리한후, 진공건조하는 정제방법에 관한 것이다.

본 발명에 이용한 소수성 폴리머는 폴리 에틸렌, 폴리프로필렌, 변형된 폴리프로필렌 및 폴리스틸렌등으로 이들 폴리머는 일반적으로 입경, 세공경 및 표면적이 서로 다른 형태가 시판되고 있으며 본 발명에 사용한 소수성 폴리머는 이런 물성에 제한 받지는 않는다. 그러나 통상적으로 사용된 소수성 폴리머의 입경은 70 μ 이상이며 분자량이 10,000~1,000,000으로 분자배열이 일정한 결정성의 물질이다. 히알루론산 함유액의 소수성 폴리머 처리 방법으로는 수용액의 pH 3~12, 온도는 0~40 $^{\circ}$ C, 농도는 0.1 $^{\circ}$ C5g/l 특히 0.5~2g/l가 바람직하다. 소수성 폴리머의 첨가량은 히알루론산 수용액 부피의 1~10%가 좋다.

히알루론산 함유액의 활성 알루미나 처리는 히알루론산 수용액에 분말 또는 입상을 활성알루미나를 첨가하여 충분히 교반한다. 히알루론산 수용액의 농도는 0.1~5g/l특히 0.5~2g/l가 바람직하며 pH는 3~10 특히6~9가 좋다. 또한 첨가한 활성알루미나의 양은 히알루론산 수용액에 대해 0.5~10% 특히 1~5%, 온도는0~40 $^{\circ}$ C가 좋으며 히알루론산 수용액의 활성알루미나 처리 시간으로 30분~3시간으로 충분히 교반한다. 본 발명에서 사용한 활성 알루미나는 통상적인 제조방법에 따른 것으로 다공성 구조와 넓은 표면적 및 활성 알루미나의 표면 화학적 특성으로 인해 기체 또는 액체의 건조제, 흡착 분리제, 촉매 등으로 광범위하게 이용되고 있다. 이들 활성 알루미나는 그 용도에 따라 여러 가지 형태가 시판되고 있으며 본 발명에 사용한 활성 알루미나는 이런 물성에 제한받지는 않는다. 그러나 입자의 크기는20~200 μ 이며 표면적이 100~500 m^2/g 의 것이 효율적이다.

본 발명에 따른 히알루론산의 정제방법은 다음과 같다.

- (1) 히알루론산이 0.1~10g/l, 바람직하게는 0.5~2g/l 정도로 용해한 처리액에 소수성 폴리머를 처리액 총부피의 1~10%, 바람직하게는 2~5%를 가하여 교반하는 공정.
- (2) 상기한 소수성 폴리머 처리액은 여과하고 여액에 활성 알루미나를 처리하여 히알루론산 수용액 총부피의 0.5~10% 특히 1~5%를 가하여 충분히 교반한 후 여과를 행하는 공정.
- (3) 상기한 (2)에 염화나트륨을 가하고 아세톤, 메탄올, 에탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 아세토니트릴 등의 수용성 유기용매를 첨가시켜 히알루론산 나트륨의 침전을 석출시켜 모액과 침전을 분리하는 공정, 및
- (4) 얻어진 침전을 50~100% 아세톤, 메탄올, 에탄올, 노말-프로판올, 아세토니트릴등의 용액으로 세척하여 진공건조하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다.

본발명에 의해 얻어진 정제 히알루론산의 극한점도법(BioChem, Biophys. Acta, 42,476(1960))에 의한 분자량은 280만 이상이다.

이하 본 발명의 실시예를 제시하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나 본 발명은 이에 한정되지는 않는다.

[실시예 1]

배양에 의해 얻어진 조히알루론산 1g을 초순수 1l에 용해하여 히알루론산 수용액을 제조한다.

조정하고 정밀여과하여 무균상태로 한다. 여액에 염화나트륨 40g을 가하고 2ℓ의 에탄올로 히알루론산 나트륨을 석출시킨다. 침전을 분리하여 95% 에탄올로 세척 후 진공건조하여 정제된 히알루론산 나트륨 0.7g을 얻었다. 얻어진 히알루론산 나트륨의 분석결과는 표1과 같다.

[표 1]

순 도	95.3%
단백질	검출안됨
핵 산	검출안됨
발열성시험	음 성

[실시에 2]

배양에 의해 얻어진 히알루론산 1g을 물 2ℓ에 용해하여 폴리프로필렌 100g을 가하고 실온에서 약 2시간 교반하고 여과한다. 여액에 활성 알루미나 100g을 가하고 10~15℃에서 3시간 교반한다. 수득된 처리액은 실시예 1과 유사하게 처리하여 정제된 히알루론산 나트륨 0.5g을 얻었다. 얻어진 히알루론산 나트륨의 분석결과는 표2와 같다.

[표 2]

순 도	96.1%
단백질	검출안됨
핵 산	검출안됨
발열성시험	음 성

[실시에 3]

배양에 의해 얻어진 조히알루론산 1g을 물 1ℓ에 용해하여 히알루론산 용액을 제조한다. 제조한 히알루론산 용액에 폴리에틸렌 50g을 가하고 실온에서 약 2시간 교반하고 여과한다. 여액에 활성 알루미나 50g을 가하고 10~15℃에서 3시간 교반한다. 수득된 처리액은 실시예 1과 유사하게 처리하여 정제된 히알루론산 나트륨 0.65g을 얻었다. 얻어진 히알루론산 나트륨의 분석결과는 표3와 같다.

[표 3]

순 도	94.1%
단백질	검출안됨
핵 산	검출안됨
발열성시험	음 성

배양에 의해 얻어진 히알루론산 1g을 물 2ℓ에 용해하여 폴리프로필렌 100g을 가하고 실온에서 약 2시간 교반하고 여과한다. 여액에 활성 알루미늄 100g을 가하고 10~15℃에서 3시간 교반한다. 수득된 처리액은 실시예 1과 유사하게 처리하여 정제된 히알루론산 나트륨 0.6g을 얻었다. 얻어진 히알루론산 나트륨의 분석결과는 표4와 같다.

[표 4]

순 도	95.6%
단백질	검출안됨
핵 산	검출안됨
발열성시험	음 성

[실시예 5]

배양에 의해 얻어진 히알루론산 1g을 물 1ℓ에 용해하여 에틸렌-프로필렌 공중합체 50g을 가하고 실온에서 약 3시간 교반하고 여과한다. 여액에 활성 알루미늄 50g을 가하고 30℃에서 3시간 교반한다. 수득된 처리액은 실시예 1과 유사하게 처리하여 정제된 히알루론산 나트륨 0.7g을 얻었다. 얻어진 히알루론산 나트륨의 분석결과는 표5와 같다.

[표 5]

순 도	93.5%
단백질	검출안됨
핵 산	검출안됨
발열성시험	음 성

[실시예 6]

배양에 의해 얻어진 히알루론산 1g을 물 1ℓ에 용해하여 폴리스틸렌 50g을 가하고 실온에서 약 3시간 교반하고 여과한다. 여액에 활성 알루미늄 100g을 가하고 30℃에서 3시간 교반한다. 수득된 처리액은 실시예 1과 유사하게 처리하여 정제된 히알루론산 나트륨 0.6g을 얻었다. 얻어진 히알루론산 나트륨의 분석결과는 표6와 같다.

[표 6]

순 도	94.1%
단백질	검출안됨
핵 산	검출안됨
발열성시험	음 성

[비교예]

배양에 의해 얻어진 조히알루론산 1g을 초순수 1ℓ에 용해하여 히알루론산 수용액을 제조한다.

제조한 히알루론산 용액에 활성 알루미늄 50g을 가하고 10~15℃에서 3시간 교반한다. 이를 정치시켜 상등액을 분리하고 원심 분리한다. 이상과 같이 행하여 수득된 히알루론산 용액의 pH를 7.0으로 조정하고 정밀여과하여 무균상태로 한다. 여액에 염화나트륨 40g을 가하고 2ℓ의 에탄올로 히알루론산 나트륨을 석출시킨다. 침전을 분리하여 95% 에탄올로 세척 후 진공건조하여 정제된 히알루론산 나트륨 0.7g을 얻었다. 얻어진 히알루론산 나트륨의 분석결과는 표7와 같다.

순 도	91.1%
단백질	검출안됨
핵 산	0.1%
발열성시험	음 성

[측정방법]

- 1) 순도: 변형된 카르바솔 방법(Anal. Biochem., 4,330 (1962))에 의해 분석
- 2) 단백질 함량: 정제 히알루론산 0.1g을 생리식염수를 넣어 10ml로하여 로리(Lowry)법에 의해 측정
- 3) 핵산: 1% 히알루론산 나트륨용액의 260nm에서의 흡광도를 측정
- 4) 발열성시험: USP Rabbit Pyrogen Test 에 따라 시행

[실험결과]

상기한 실시예 및 비교예에서 알 수 있는 바와 같이 상기한 정제방법에 의하여 고순도의 히알루론산을 얻을 수 있었고, 소수성 폴리머 처리를 하지 않은 비교 예에서는 핵산이 검출됨을 알 수 있었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- (1) 히알루론산을 0.1~10g/l, 바람직하게는 0.5~2g/l 정도로 용해한 처리액에 소수성 폴리머를 처리액 총부피의 1~10%, 바람직하게는 2~5%를 가하여 교반하는 공정.
- (2) 상기한 소수성 폴리머 처리액을 여과하고 여과에 활성 알루미나를 처리하여 히알루론산 수용액 총부피의 0.5~10%, 특히 1~5%를 가하여 충분히 교반한 후 여과를 행하는 공정.
- (3) 상기한 (2)에 염화나트륨을 가하고 아세톤, 메탄올, 에탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 아세토니트릴 등으로 이루어진 군에서 선택된 수용성 유기용매를 참가시켜 히알루론산 나트륨의 침전을 석출시켜 모액과 침전을 분리하는 공정, 및,
- (4) 얻어진 침전을 50~100% 농도의 아세톤, 메탄올, 에탄올, 노말-프로판올, 아세토니트릴 등으로 이루어진 군에서 선택된 용액으로 세척하여 진공건조하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 히알루론산의 정제방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기한 소수성 폴리머는 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 변형된 폴리프로필렌 및 폴리스틸렌임을 특징으로 하는 히알루론산의 정제방법.